高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

基于高内吞效率的核酸适体构建LYTACs嵌合体以增强白血病细胞膜蛋白的降解

陈卓然，龚玲玉，艾立丽，张　鹏，周艳华
（贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心，贵州生物制造实验室，
功能核酸生物药研究重点实验室，贵阳 561108）

摘要　基于溶酶体靶向嵌合体(LYTACs)技术，以具有高内吞效率的转铁蛋白受体(Transferrin receptor 1，TfR1/CD71)特异性核酸适体HG9作为识别模块，通过共价连接溶酶体导向配体三乙酰半乳糖胺(tri-GalNAc)，设计合成了一种新型双功能嵌合分子HG9-10-tri，旨在实现CD71的高效、特异性降解. 研究结果表明，通过筛选获得HG9与tri-GalNA之间最佳连接子长度，且该嵌合分子在不改变其稳定性及对人髓性单核细胞白血病细胞(MV4-11)亲和力的前提下，能够特异性识别急性髓细胞性白血病(AML)细胞系，并通过去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)介导的内吞-溶酶体途径显著下调细胞表面CD71蛋白表达水平，降解作用呈现明显的时间和浓度依赖性. 并且CD71降解能够有效抑制MV4-11细胞的活力，并进一步诱导细胞凋亡与G1期周期阻滞，为治疗CD71高表达的急性髓系白血病提供了新策略.

关键词　转铁蛋白受体(CD71)；细胞膜降解；溶酶体靶向嵌合体(LYTACs)；核酸适体；三乙酰半乳糖胺
中图分类号　Q52　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20260017

High-internalization-efficiency Aptamer-based LYTACs Chimera for Enhanced Degradation of Leukemia Cell Membrane Proteins

CHEN Zhuoran, GONG Lingyu, AI Lili, ZHANG Peng, ZHOU Yanhua*
(*Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Biomanufacturing Laboratory, Key Laboratory of Functional Nucleic Acids-Based Biopharmaceutical Research, Guizhou Medical University, Guiyang* 561108, *China*)

Abstract　In this study, we developed a novel bifunctional lysosome-targeting chimera (LYTAC), designated HG9-10-tri, by covalently conjugating tri-GalNAc (a lysosome-trafficking ligand) to HG9, an aptamer that binds transferrin receptor 1 (TfR1/CD71) with high affinity and internalization efficiency. This chimeric molecule was designed to achieve potent and selective degradation of CD71. Following the optimization of the linker length between HG9 and tri-GalNAc, we demonstrated that HG9-10-tri retains unaltered stability and binding affinity for human acute monocytic leukemia (MV4-11) cells while specifically recognizing acute myeloid leukemia (AML) cell lines. Mechanistically, HG9-10-tri engages the asialoglycoprotein receptor (ASGPR) to trigger endocytosis and lysosomal trafficking, resulting in significant downregulation of cell surface CD71 protein levels in a time- and concentration-dependent manner. Functionally, CD71 degradation suppressed MV4-11 cell viability, induced apoptosis, and triggered G1 phase cell cycle arrest. Collectively, these findings establish HG9-10-tri as a promising therapeutic

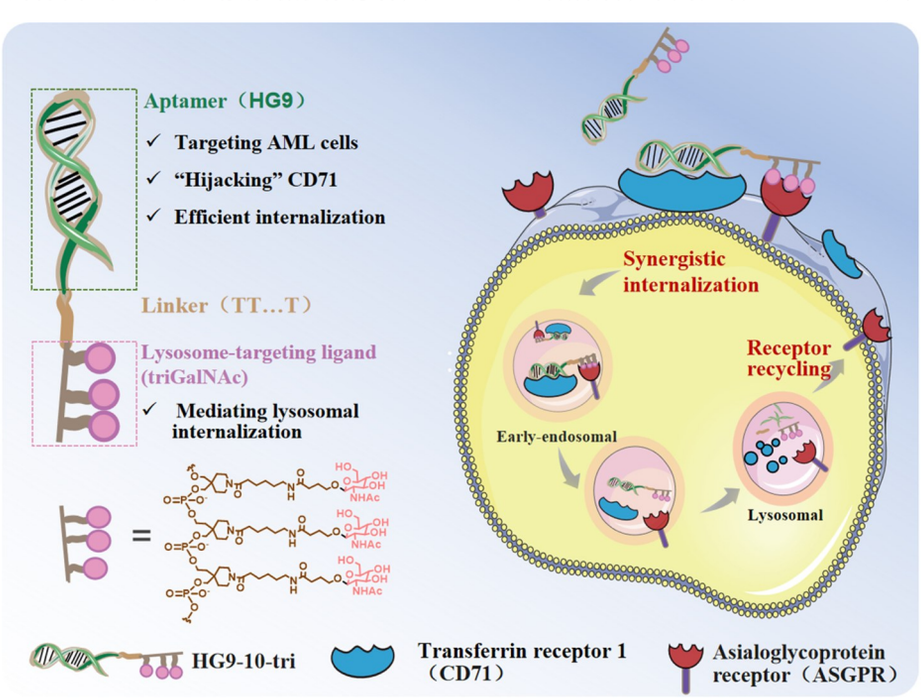
收稿日期：2026-01-08. 网络首发日期：2026-03-25.
联系人简介：周艳华，男，博士，副教授，主要从事功能核酸设计与应用方面的研究. E-mail：zhouyanhua@gmc.edu.cn
基金项目：国家自然科学基金(批准号：81960036，22564008)、贵州省教育厅高校科技创新团队(批准号：黔教计[2023]068)和贵州省卫生健康委科学技术基金项目(批准号：gzwkj2021-157，2024GZWJKJXM0466)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos. 81960036, 22564008), the Higher Education Institutions Scientific and Technological Innovation Team of Guizhou Province, China(No. qianjiaoji2023-068) and the Scientific and Technological Fund Program of Guizhou Provincial Health Commission, China(Nos.gzwkj2021-157, 2024GZWJKJXM0466).

strategy for CD71-overexpressing acute myeloid leukemia.

Keywords CD71; Cell membrane degradation; Lysosome-targeting chimera(LYTACs); Aptamer; Triacetylgalactosamine(tri-GalNAc)

蛋白质稳态是蛋白质形成与降解之间的平衡，恶性细胞依赖蛋白质降解机制来补充细胞中的氨基酸供应. 利用蛋白质降解机制治疗血液恶性肿瘤已成为有效方法[1,2]，尤其是白血病等恶性血液肿瘤的失控性增殖，其恶性增殖高度依赖于铁元素为核心的基础代谢及生物合成作为关键供给[3,4]，白血病细胞依赖于铁离子底物，转铁蛋白受体1(CD71)作为铁离子内吞进入细胞的关键跨膜“门户”蛋白[5]，可介导铁离子转运功能[6]，而CD71在白血病细胞表面的特异性高表达[7,8]，能显著提升铁离子摄取效率[9]，为细胞异常增殖提供关键物质保障[10]，是驱动白血病进展的重要分子机制[11]，这一特点使其成为一个公认的潜在治疗靶点. 然而，传统的靶向策略(如抗体药物和小分子抑制剂)仅能抑制CD71的功能活性，无法完全阻断铁离子向白血病细胞的持续供给[12]，难以实现其蛋白水平的彻底清除，进而极易诱发代偿性铁摄取信号通路激活及耐药性问题[12~14]. 因此，开发具有高效性、特异靶向降解细胞膜表面CD71蛋白的新型疗法，对治疗白血病等恶性肿瘤具有重要临床价值.

近年来，靶向蛋白降解技术(TPD)成为癌症及其它疾病治疗干预的重要策略[15]，已从针对胞内蛋白的蛋白水解靶向嵌合体(PROTACs)拓展至靶向膜蛋白的溶酶体靶向嵌合体(LYTACs)的迭代[16]. 在LYTACs中，其双功能分子可桥接靶蛋白与溶酶体靶向受体，将靶点蛋白“劫持”溶酶体进行降解，进而实现对疾病发生和发展关键蛋白的清除[17]. 在LYTACs的构建中，核酸适体凭借其高亲和力、低免疫原性及易于精准修饰等优势成为理想的靶向模块[18]. 如，Huang等[19]提出了一种名为“DNA纳米列车”的创新药物递送平台，能够精准携带预先确定的多种药物组合，通过协同作用实现对癌症的高效联合治疗，但即便搭载这类高效靶向模块，传统LYTACs策略的降解效率仍受限于其内吞及溶酶体定向递送的效率[20]. 究其原因，该策略依赖的递送过程完全依赖于溶酶体靶向受体(如CI-M6PR)的内吞途径，若靶蛋白本身的内吞效率较低，或与LYTACs分子的结合无法有效促进其向溶酶体的转运，会削弱靶蛋白降解的效能[21~23]. 为解决上述依赖单一内吞途径引发的效率瓶颈，本研究选取一条对CD71兼具高亲和力与高效内吞效率的核酸适体HG-9，将其作为靶向“弹头”(Scheme 1). 通过在HG9固相合成过程中引入与可特异性识别去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的溶酶体导向配体tri-GalNAc，构建了新型双



Scheme 1 Schematic diagram of the synergistic internalization mechanism in AML cells mediated by the HG9 aptamer conjugated with a lysosome-targeting ligand

功能嵌合HG9-10-atri-GalNAc(HG9-10-tri)[24,25]. 本研究系统筛选了HG9适体与tri-GalNAc之间的最佳连接子长度，对于维持适体结合活性与确保有效内吞至关重要，这一优化策略在已有aptamer-LYTACs研究中鲜见报道. 该策略中，核酸适体HG9不仅负责精准识别CD71，其固有的优异内吞特性更与ASGPR途径形成协同效应，共同驱动促进整个LYTACs-靶蛋白高效靶向溶酶体降解途径. 本研究旨在突破传统LYTACs对溶酶体靶向受体单一路径的被动依赖，为开发高效靶向降解CD71的白血病治疗策略提供了新思路.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

人髓性单核细胞白血病细胞系(MV4-11细胞，Biphenotypic B myelomonocytic leukemia)，美国ATCC公司；CD71抗体，武汉爱博泰克公司；BCA试剂盒、Lyso-Tracker Red(溶酶体红色荧光探针)，上海碧云天生物科技有限公司；胎牛血清(FBS)，上海惠颖生物公司；核酸适体偶联三乙酰半乳糖胺(*N*-Acetylgalactosamine)及所有引物见表1，上海生工公司；溶酶体抑制剂巴非霉素A1(Bafilomycin A1)及蛋白酶体抑制剂(MG132)，美国MCE公司；CCK8，广西卓一生物公司；周期检测试剂盒，大连美仑生物；凋亡检测试剂盒，杭州联科生物；网格蛋白抑制剂(Chlorpromazinec)，上海优宁维生物公司；ChemiDoc MP型化学发光凝胶成像系统，美国Bio-Rad公司；BD LSRFortessa型流式细胞仪，美国BD公司；Nikon-AXR型共聚焦显微镜，日本尼康公司.

Table 1 Primer sequences used in this study

Aptamer	Sequence
HG9	GGATAGGGATTCTGTTGGTCGGCTGGTTGGTATCC
XQ2d	GCTCATAGGGTTAGGGGCTGCTGGCCAGATACTCAGATGGTAGGGTTACTATGAGC
HG9-5	GGATAGGGATTCTGTTGGTCGGCTGGTTGGTATCCTTTAT
HG9-10	GGATAGGGATTCTGTTGGTCGGCTGGTTGGTATCCTTTATGATAA
HG9-15	GGATAGGGATTCTGTTGGTCGGCTGGTTGGTATCCTTTATGATAATTAGG
HG9-20	GGATAGGGATTCTGTTGGTCGGCTGGTTGGTATCCTTTATGATAATTAGGTTGTA
RS-10	ATTCTTCCTGCGCGATTCTGTTCTCTGTATATTCGTCGCTGGTTGG
XQ2d-tri	GCTCATAGGGTTAGGGGCTGCTGGCCAGATACTCAGATGGTAGGGTTACTATGAGC

1.2 实验过程

1.2.1 *MV4-11细胞的培养* 将MV4-11细胞培养在37 ℃，5%CO_2恒温培养箱中. 完全培养基为IMDM培养基，含20%胎牛血清(FBS)和1%青链霉素双抗，细胞离心条件：1000 r/min，3 min.

1.2.2 *细胞对内吞能力检测* 将细胞密度培养至1×10^5个，与终浓度为2 μmol/L FAM荧光标记的XQ2d及HG9于37 ℃下共同孵育2 h. 样品重悬于洗涤缓冲液(500 mL PBS +2.5 mL 1 mol/L $MgCl_2$+2.25 g葡萄糖)中. 孵育完成后，用洗涤缓冲液洗涤3次(1000 r/min，3 min). 利用流式细胞仪与共聚焦荧光显微镜检测XQ2d及HG9细胞的内吞效率.

1.2.3 *细胞的亲和力检测* 将浓度为200 nmol/L FAM荧光标记的HG9-10-tri及HG9-10分别与2×10^5个MV4-11细胞在冰上共孵育30 min后，用洗涤缓冲液洗涤3次(1000 r/min，3 min). 利用流式细胞仪检测HG9-10-tri及HG9-10对MV4-11细胞的亲和力.

1.2.4 *Western Blot(WB)检测* 将MV4-11细胞以每孔2×10^5个的密度接种于12孔板中，分别加入5 μmol/L样品，终体积为1 mL(无菌水)，分为空白组(加入等体积溶剂)、HG9-tri组、HG9-5-tri组、HG9-10-tri组、HG9-15-tri组和HG9-20-tri组，孵育72 h后收集细胞并提取总蛋白. WB实验操作参考文献[26]方法，最终结果用于确定不同长度LYTACs对MV4-11细胞CD71蛋白的降解能力.

1.2.5 *HG9-10-tri与溶酶体共定位实验* 取2×10^5个MV4-11细胞，分别与2 μmol/L HG9-10-tri-FAM，RS-10-FAM及FAM于37 ℃孵育1 h；加入200 nmol/L溶酶体红色荧光探针(Lyso-Tracker Red)，继续于37 ℃孵育1 h，总孵育时间为2 h. 用PBS缓冲液洗涤3次(1000 r/min，3 min)，加入1 μg/mL Hoechst染料室温下避光染色10 min，再用PBS缓冲液洗涤3次(1000 r/min，3 min). 最后，用200 μL洗涤缓

冲液重悬细胞，转移至共聚焦培养皿中进行观察.

1.2.6 小鼠体内靶向实验 构建了MV4-11细胞荷瘤小鼠模型，即将1×10^7个MV4-11细胞接种于6~8周龄裸鼠的右前肢腋下，待7 d后肿瘤体积生长至约300 mm^3时，将小鼠随机分为两组，分别通过尾静脉注射50 μmol/L Cy5标记探针. 实验组HG9-10序列偶联三乙酰半乳糖胺(HG9-10-tri-Cy5)，对照组随机序列偶联三乙酰半乳糖胺(Rs-10-tri-Cy5). 分别于注射后1，2，4，6和8 h时，用小动物活体成像仪(Cy5通道，$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 640 nm/680 nm)动态监测荧光分布，所有成像参数均保持一致.

1.2.7 Native-PAGE检测HG 9-10-tri的稳定性实验 分别配制终浓度为2 μmol/L的HG9-10与HG9-10-tri溶液于37 ℃，5%CO_2的恒温培养箱中，分别检测2，4，8，12，24，36，48和72 h时其嵌合体的稳定性. 凝胶配方为3 mL超纯水+3 mL 30%丙烯酰胺-双丙烯酰胺混合液(Acr-Bis)+1. 5 mL 5×TBE缓冲液，最后加入55 μL 10%APS和5 μL TEMED，充分混合后迅速灌入玻璃板并插入合适的梳子. 制胶架需放置在水平桌面上，室温下待胶液凝固约0. 5 h(温度较高时可适当缩短凝固时间). 凝胶完成后，使用1×TBE作为缓冲液，每孔加入5 μL DNA(终浓度为2 μmol/L)，设置200 V电压，电泳运行30 min.

1.2.8 共聚焦检测HG9-10-tri与ASGPR的协同作用 向1×10^6个MV4-11细胞中加入5 μmol/L HG9-10-tri，HG9-10和RS-10-tri，于37 ℃共孵育1 h后，加入溶酶体红色荧光探针(Lyso-Tracker Red)孵育1 h(共2 h)，随后加入1 μg/mL Hoechst染料于室温下避光染色10 min，再次用PBS缓冲液洗涤3次(1000 r/min，3 min). 最后，用200 μL洗涤缓冲液重悬细胞，转移至共聚焦培养皿中进行共聚焦成像.

1.3 HG9-10-tri对细胞降解效应及CD71的降解能力

1.3.1 细胞毒性实验 实验中检测了HG9-10-tri对MV4-11细胞的毒性. 将处于对数生长期的MV4-11细胞以5×10^3个/孔的密度接种于96孔板中；分别设置0，1，10，100，5000和10000 nmol/L 6个浓度的HG9-10-tri处理组，并设立HG9-10对照组. 将细胞在于37 ℃，5%CO_2条件下培养72 h后，每孔加入10 μL CCK8试剂，混合均匀后继续孵育2 h，采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度(OD值). 通过$OD_{450\,nm}$数据计算得出细胞活力，并用GraphPad Prism软件拟合出IC_{50}值.

1.3.2 细胞凋亡实验 采用Annexin V/PI双染法进行细胞凋亡实验. 将MV4-11细胞以2×10^5个/孔接种于6孔板中，分别加入5 μmol/L HG9-10-tri及HG9-10对照，并于37 ℃培养箱中孵育72 h. 将培养液与细胞一同转移至离心管中，以1000 r/min转速下离心5 min收集细胞. 弃去上层清液，将细胞重悬于1×磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤2次，以去除残留处理物和培养基成分. 按照凋亡试剂盒说明书进行染色. 随后，将细胞重悬于100 μL 1×缓冲液中，加入Annexin V-FITC和PI染液，室温下避光孵育30 min. 最后，补充适量缓冲液，使用流式细胞仪进行检测，4个象限：Q1(左下)代表活细胞(Annexin V^-/PI^-)；Q2(右下)代表早期凋亡细胞(Annexin V^+/PI^-)；Q3(右上)代表晚期凋亡/坏死细胞(Annexin V^+/PI^+)；Q4(左上)代表坏死或机械损伤细胞(Annexin V^-/PI^+).

1.3.3 细胞周期实验 为了探究HG9-10及HG9-10-tri对MV4-11细胞周期的影响，采用碘化丙啶(PI)染色结合流式细胞术进行了分析. 取对数生长期的MV4-11细胞置于12孔板中，分别加入5 μmol/L HG9-10和HG9-10-tri处理72 h后，收集约5×10^5个细胞，以1000 r/min转速下离心5 min，弃去上层清液；用1 mL PBS缓冲液洗涤，再次离心弃上层清液. 将细胞用300 μL PBS缓冲液重悬，缓慢滴加1. 2 mL预冷的无水乙醇(于−20 ℃预冷12 h)，同时振荡混合均匀，于−20 ℃放置过夜. 固定后，以1000 r/min转速下离心3 min，弃去上层清液，加入1 mL PBS缓冲液重悬细胞，室温下静置15 min使细胞充分水化. 再次离心弃去上层清液体，加入100 μL RNase A溶液(预先溶解并冰浴备用)重悬细胞，于37 ℃水浴消化30 min. 然后加入400 μL PI染液(50 μg/mL)，充分混合均匀，于2~8 ℃避光孵育30 min后，立即用流式细胞仪，在于激发波长488 nm处采集红色荧光信号. 全程注意避光操作，确保染色效果稳定.

1.3.4 活死染色实验 采用钙黄绿素-AM(Calcein-AM)/碘化丙啶(PI)活死细胞双染试剂盒进行活死染色实验. 将处于对数生长期的MV4-11细胞以1×10^5个/孔的密度接种于24孔板中，加入终浓度为5 μmol/L的HG9-10-tri和HG9-10，终体积为1 mL. 将细胞置于37 ℃，5%CO_2的培养箱中孵育72 h后，

弃去上层清液，用PBS缓冲液轻柔洗涤细胞2次(1000 r/min，3 min)．随后，按照试剂盒说明书配制染色工作液，每孔加入300 μL，于37 ℃避光孵育15~30 min．染色完成后，用PBS缓冲液洗涤2次以去除背景荧光，立即使用配备20倍物镜的荧光显微镜进行观察和图像采集．其中，活细胞胞质内的酯酶可将Calcein-AM水解为发出均匀绿色荧光的钙黄绿素(激发/发射波长分别为494 nm/517 nm)，而膜结构受损的死细胞则被PI染核，发出红色荧光(激发/发射波长分别为535 nm/617 nm)．

1.3.5　CD71蛋白降解途径实验　将MV4-11细胞按1×10^{6}个/孔接种于6孔板中，分别加入200 nmol/L溶酶体抑制剂Bafilomycin A1和蛋白酶体抑制剂MG132预处理2 h，随后加入HG9-10-tri共同处理72 h(持续维持抑制剂浓度)．最后，收集细胞蛋白，利用WB检测CD71蛋白含量．

1.4　统计学处理

WB条带数据使用ImageJ进行统计分析，统计图绘制使用GraphPad Prism9.5版绘制和显著性分析；用单因素方差(One-way ANOVA)分析进行多组数据间的比较，方差不齐时用非参数检验法进行分析，比较时使用独立样本t检验(P<0.05，差异显著；P<0.01，差异极显著；P<0.001，差异高度显著)．

2　结果与讨论

2.1　HG9-tri的设计及优化

LYTACs的降解效率高度依赖于其对靶标蛋白的内吞与递送能力，筛选具有高内吞效率的靶向配体是构建高效LYTACs体系的关键前提[27]．实验中选取文献[28,29]报道的2条CD71靶向核酸适体(XQ2d和HG9)，比较了2条核酸适体在MV4-11细胞中的摄取．图1(A)~(C)所示结果表明，在孵育

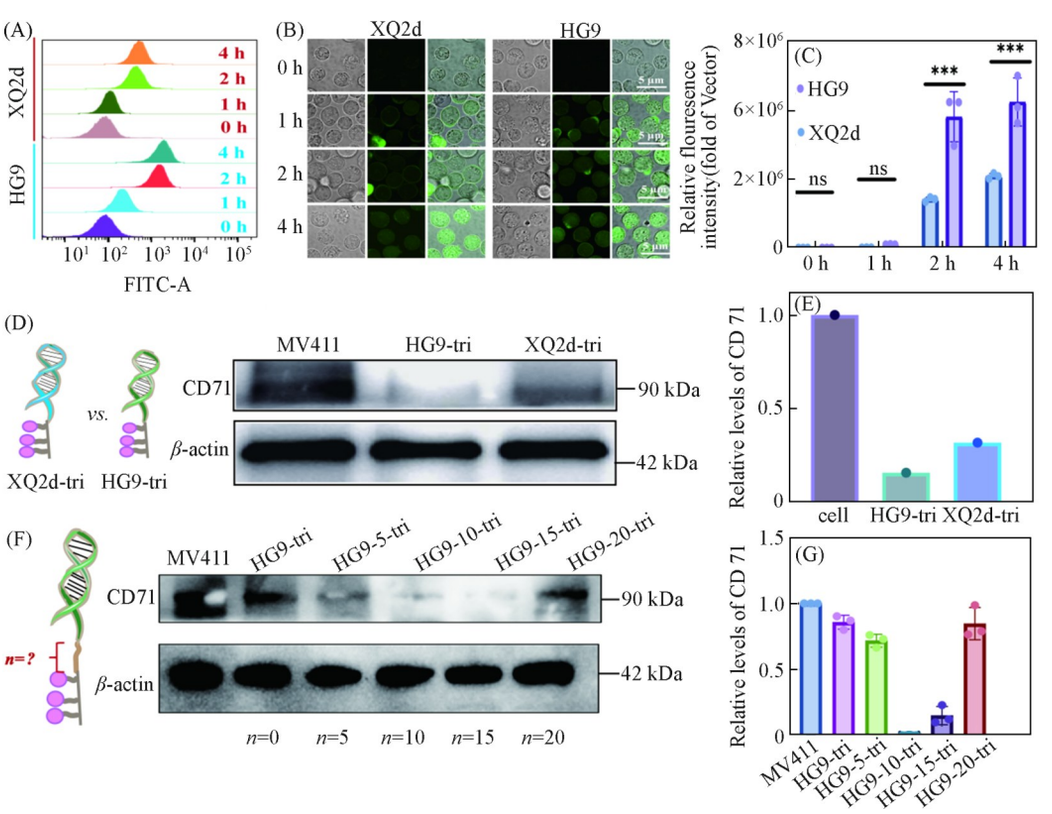


Fig. 1　Design and characterization of HG9-*n*-tri

(A) Flow cytometry detection of MV4-11 uptake of XQ2d-FAM and HG9-FAM within 0—4 h; (B) confocal fluorescence microscopy observation of MV4-11 cell uptake of FAM-labeled XQ2d and HG9 within 0—4 h (bar=5 μm); (C) quantitative analysis of time-dependent uptake of FAM-labeled XQ2d and HG9 by MV4-11 cells (0—4 h); (D) WB analysis of CD71 degradation in MV-4-11 cells treated with indicated concentrations of HG9-10-tri or XQ2d-tri; (E) comparison of CD71 protein degradation efficiency by HG9-tri or XQ2d-tri; (F) WB detection of CD71 protein degradation by HG9-10-tri conjugates with different linker lengths (n=5, 10, 15, 20); (G) comparison of CD71 protein degradation efficiency by HG9-n-tri conjugates with different linker lengths.

2和4 h时，HG9右移更大，HG9的荧光强度显著高于XQ2d（$P<0.001$），说明相同浓度下HG9的内吞效率显著优于XQ2d，并且WB检测显示HG9-tri对MV4-11细胞上CD71蛋白的降解效果优于XQ2d-tri［图1(D)和(E)］. 基于上述结果，选择HG9作为核心靶向模块，通过调控HG9与溶酶体导向配体tri-GalNAc之间系统调节连接子长度（5，10，15和20 bp），构建了一系列HG9-*n*-tri偶联物，以优化筛选其降解活性. 用不同的HG9-*n*-tri处理MV4-11细胞并通过WB实验比较降解效果. 结果表明，连接子长度为10 bp时HG9-10-tri对MV4-11细胞膜表面CD71蛋白的降解效率最高［图1(F)和(G)］，表明所构建的HG9-10-tri可有效降解CD71.

2.2 HG9-10-tri体内外靶向性验证

为探究tri-GalNAc修饰是否影响HG9-10对MV4-11细胞的靶向能力，将不同浓度的HG9-10-tri与未修饰的HG9-10分别与MV4-11细胞共孵育，并通过流式细胞术检测其结合情况. 结果显示，相同浓度作用下，HG9-10-tri和HG9-10与细胞的靶向结合能力相当［图2(A)］. 进一步拟合二者的结合曲线，得出HG9-10-tri的解离常数值K_d=7.880 nmol/L，HG9-10的K_d=4.045 nmol/L［图2(B)］，表明tri-GalNAc修饰并未明显改变HG9-10对MV4-11细胞的结合亲和力.

为探究HG9-10核酸适体上接入tri-GalNAc后对其稳定性的影响，于37 ℃下进行了不同时间点的稳定性检测. 通过12% native page表征发现，HG9-10接入tri-GalNAc后稳定性无明显改变［图2(C)和

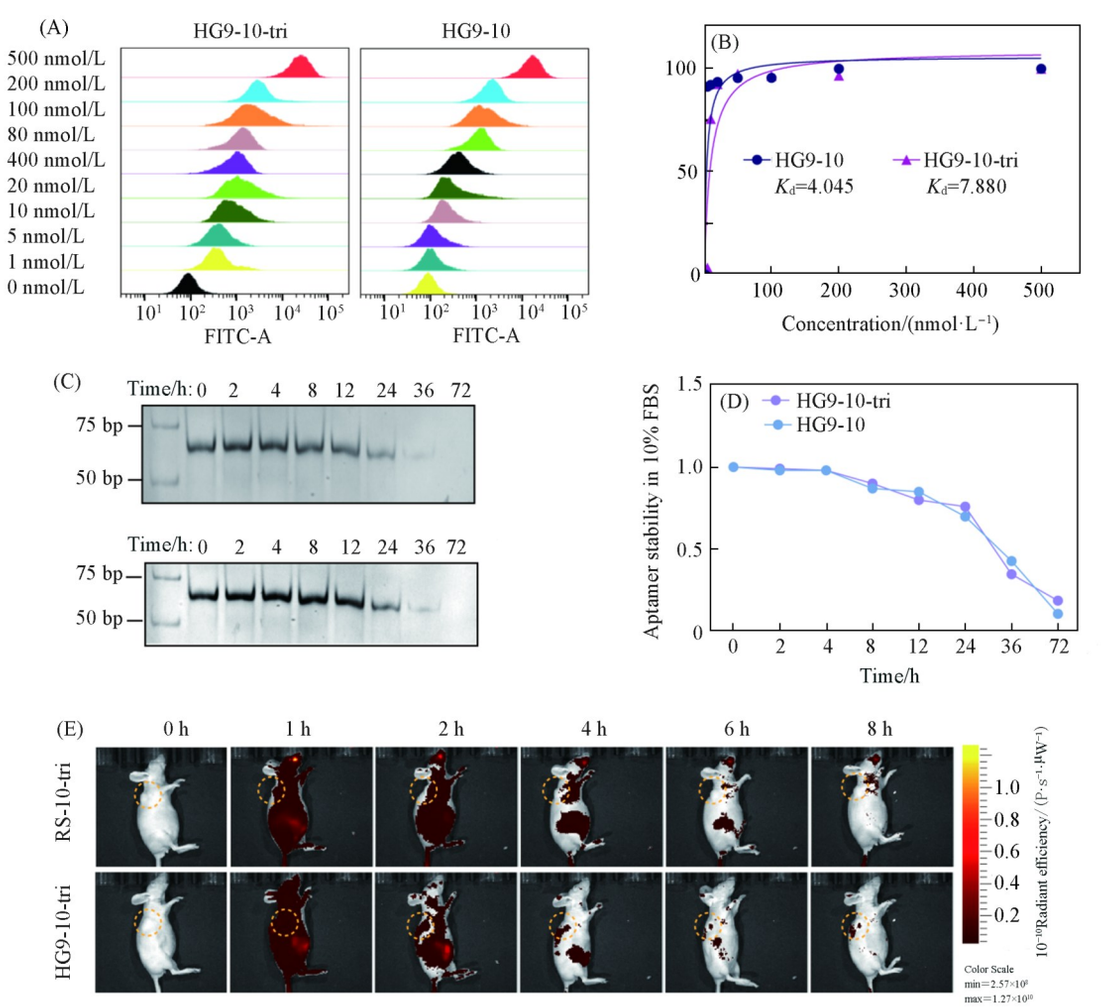


Fig. 2 Analysis of the targeting capability of HG9-10-tri *in vitro* and *in vivo*

(A) Flow cytometry detection of binding capacity of HG9-10 and HG9-10-tri at gradient concentrations to MV4-11; (B) dissociation constant fitting curves of HG9-10 and HG9-10-tri for MV4-11; (C) stability analysis of HG9-10 and HG9-10-tri in medium containing 10% FBS at 37 ℃; (D) statistical analysis of HG9-10 and HG9-10-tri stability in 10% FBS; (E) comparative *in vivo* imaging of targeting effects of RS-10-tri-Cy5 and HG9-10-tri-Cy5 in leukemia model mice.

(D)]. 为验证HG9-10-tri在体内的靶向情况，在HG9-10-tri上修饰Cy5荧光分子(HG9-10-tri-Cy5)，并以随机序列(RS)偶联tri-GalNAc修饰Cy5荧光分子(RS-10-tri-Cy5)作为对照. 将2条序列分别通过尾静脉注射到MV4-11荷瘤小鼠体内，通过体内成像比较了HG9-10-tri-Cy5和RS-10-tri-Cy5在小鼠体内的分布. 结果显示，注射4 h后，相较于对照组，HG9-10-tri-Cy5组的荧光分布在肿瘤部位出现明显富集[图2(E)]. 综上，从体外结合亲和力与体内靶向分布两方面证实，tri-GalNAc修饰对HG9-10特异性结合性能并未造成明显影响，为其靶向识别和特异性降解奠定了基础.

2.3 HG9-10-tri协同ASGPR的内吞通过网格蛋白途径进入胞内

为探究HG9-10-tri是否通过ASGPR协同进入溶酶体，首先将HG9-10的对照序列RS-10与tri-GalNAc偶联，获得RS-10-tri. 分别用HG9-10-tri和RS-10-tri处理MV4-11细胞后，共聚焦显微镜观察显示，HG9-10-tri组中FAM标记探针与溶酶体的共定位信号明显强于RS-10-tri组[图3(A)和(B)]；而RS-10-tri组也存在一定程度的共定位，推测是由于tri-GalNAc部分介导的非特异性内吞所致. 目前已有研究表明，HG9核酸适体与ASGPR主要通过网格蛋白介导的内吞途径进入细胞[30]. 为进一步验证

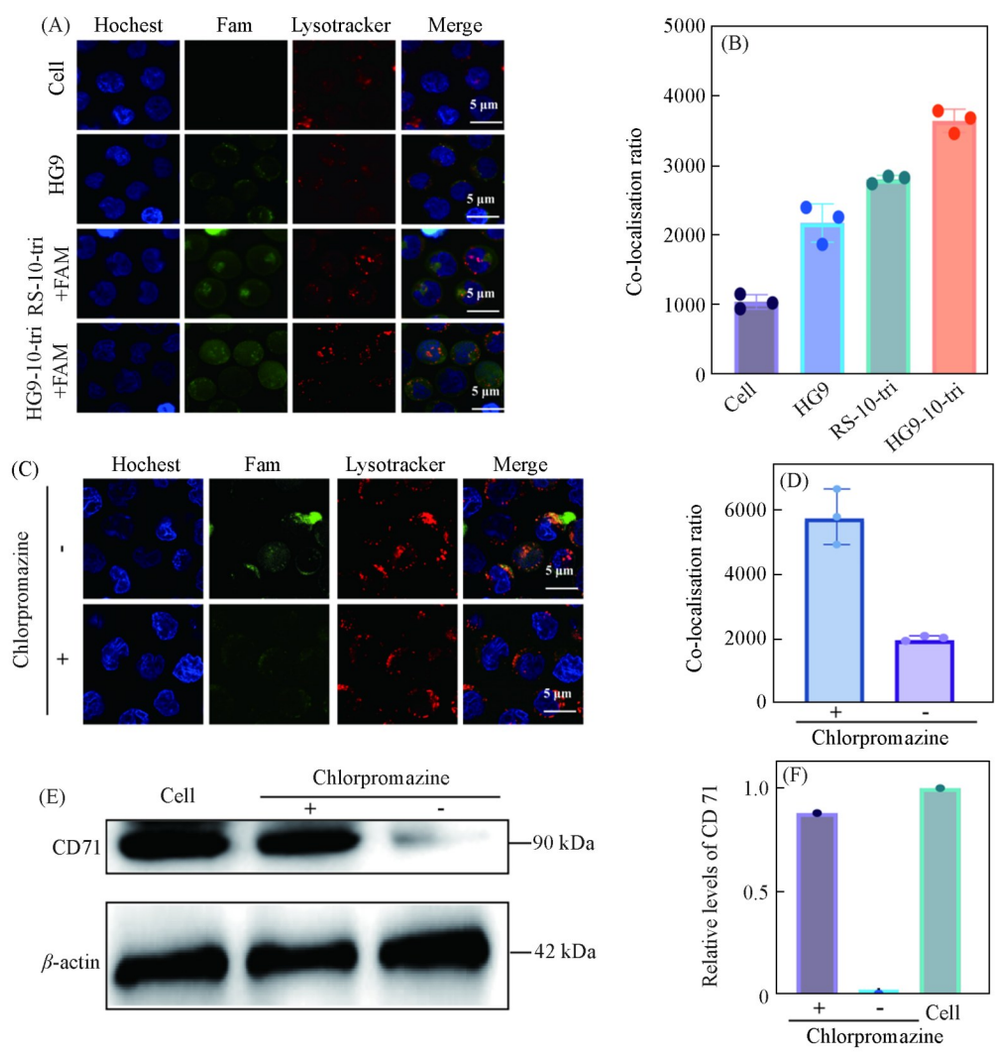


Fig. 3 Investigation of ASGPR-mediated Endocytosis of HG9-10-tri *via* the Clathrin-Mediated Pathway

(A) Confocal microscopy images showing the colocalization of lysosomes with FAM-labeled HG9-10-tri or RS-10-tri in MV4-11 cells; (B) quantification of the fluorescence colocalization between lysosomes and FAM-labeled HG9-10-tri in MV4-11 cells corresponding; (C) confocal images showing colocalization of lysosomes and FAM-labeled HG9-10-tri in MV4-11 cells; (D) quantification of the fluorescence colocalization between lysosomes and FAM-labeled HG9-10-tri in MV4-11 cells(corresponding to A); (E) WB analysis of CD71 protein degradation in MV4-11 cells treated with Chlorpromazine; (F) quantification of the gray values from the WB results showing CD71 protein degradation.

ASGPR是否通过网格蛋白途径介导HG9-10-tri进入溶酶体，使用网格蛋白抑制剂氯丙嗪(Chlorpromazine)预处理MV4-11细胞，通过共聚焦显微镜观察FAM标记的HG9-10-tri在溶酶体中的分布．结果表明，经氯丙嗪处理后，溶酶体内FAM标记的HG9-10-tri共定位信号明显减弱[图3(C)和(D)]．同时，WB实验结果表明，氯丙嗪处理可抑制CD71蛋白的降解[图3(E)和(F)]．上述结果表明，HG9-10-tri通过ASGPR特异性识别，经网格蛋白介导的内吞途径进入细胞并转运至溶酶体，进而影响CD71蛋白的降解过程．

2.4 HG9-10-tri靶向降解CD71

为探究HG9-10-tri进入细胞后是否进入溶酶体，对HG9-10-tri-Fam与溶酶体探针(Lysotracker)进行了共定位成像．结果显示，内吞到MV4-11细胞内的HG9-10-tri-FAM(绿色)信号与溶酶体(橙色)和溶酶体探针共定位[图4(A)和(B)]，这表明tri-GalNAc修饰能促使HG9-10-tri在MV4-11细胞中进入溶酶体途径．为探究对溶酶体降解途径的依赖性，采用溶酶体抑制剂Bafilomycin A1和蛋白酶体抑制剂

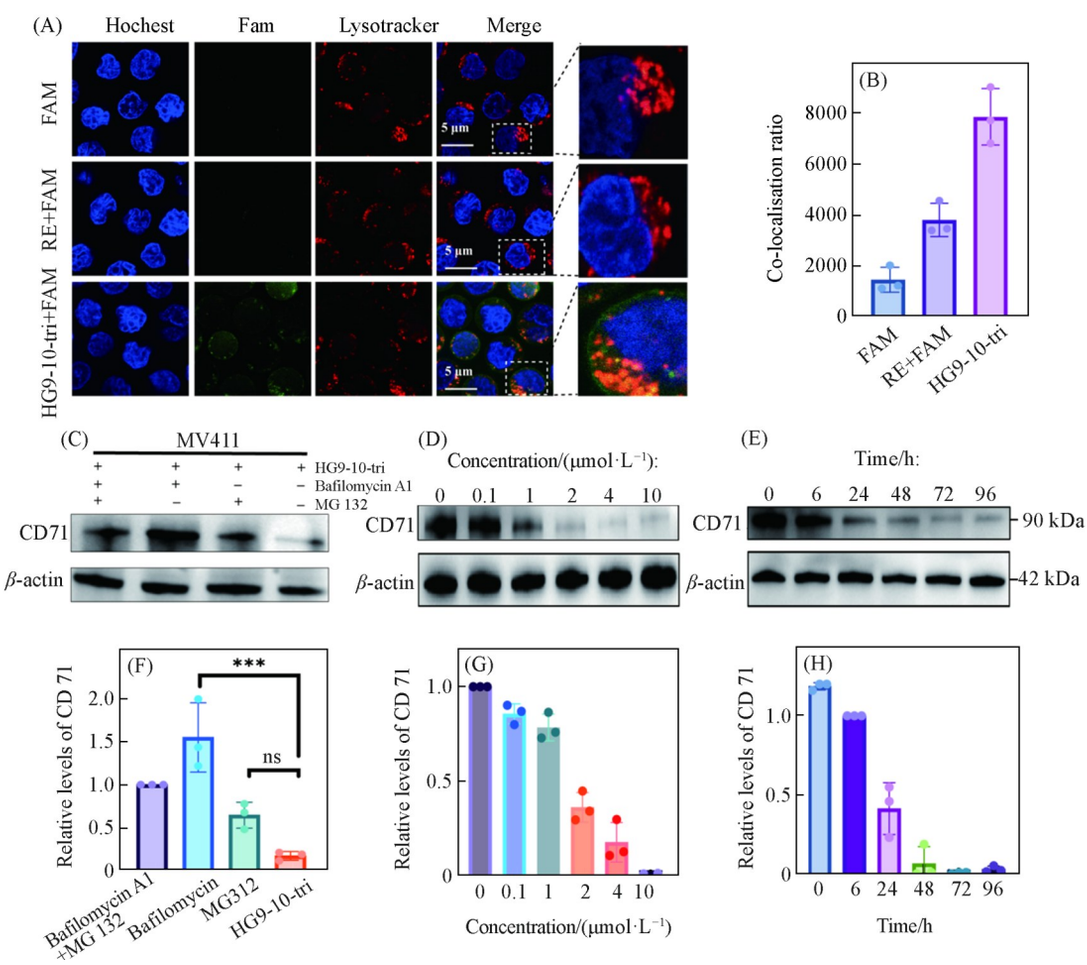


Fig. 4 HG9-10-tri targets the lysosome to degrade CD71 protein

(A) Confocal microscopy images of cells incubated with 2 μmol/L Fam, Rs-10-Fam, and HG9-10-tri-Fam for 2 h; the nuclei were stained with Hoechst (blue), lysosomes were stained with a specific dye(red), internalized HG9-10-tri-Fam appears green, and merged regions are shown in yellow(scale bar: 5 μm); (B) statistical analysis of the colocalization between lysosomes and HG9-10-tri-FAM captured by confocal microscopy; (C) WB analysis of CD71 protein degradation; (D) concentration-dependent degradation of CD71 protein by HG9-10-tri and corresponding grayscale value statistics; (E) time-dependent degradation of CD71 protein and corresponding grayscale value statistics; (F) statistical analysis of CD71 degradation in MV4-11 cells treated with various protein inhibitors; (G) quantitative analysis of CD71 degradation in MV4-11 cells treated with increasing concentrations of HG9-10-tri; (H) quantitative analysis of CD71 degradation in MV4-11 cells treated with 5 μmol/L HG9-10-tri for the indicated time periods.

MG132分别处理细胞，并通过WB实验检测经抑制剂处理后HG9-10-tri降解CD71蛋白水平的变化．结果表明，用溶酶体抑制剂预处理MV4-11细胞后，HG9-10-tri对CD71的降解效果被抑制，MG132对CD71降解效果略受抑制，推测可能是经MG132处理后泛素池耗竭导致自噬底物识别受阻，表现为降解被抑制[图4(C)和(F)]，可见HG9-10-tri对CD71的降解主要依赖于溶酶体途径实现，符合LYTACs技术的经典作用模式，即通过“劫持”溶酶体靶向受体实现细胞膜蛋白的清除．进一步评估了HG9-10-tri依赖浓度和处理时间对CD71的降解情况，结果显示，HG9-10-tri浓度升高至1 μmol/L后，CD71的蛋白水平明显下降，在HG9-10-tri浓度为4~10 μmol/L时达到最佳降解效果[图4(D)和(G)]．选取浓度较低的4 μmol/L HG9-10-tri采用不同时间处理MV4-11时，24 h表现出明显变化，48 h后趋于稳定，显示出对CD71蛋白的最佳降解效果[图4(E)和(H)]．这种典型的剂量-效应关系，验证了LYTACs分子作用的可调控性，其对CD71的降解呈现明确的浓度与时间依赖性．

2.5 HG9-10-tri体外毒性

HG9-10-tri可通过ASGPR介导的溶酶体降解途径有效下调MV4-11细胞中CD71的蛋白水平．为评估其对细胞毒性的影响，首先采用CCK-8法检测了细胞活力变化．结果显示，与未修饰的HG9-10阴性对照相比，HG9-10-tri处理显著抑制了MV4-11细胞的活力，表现出更强的细胞毒性[图5(A)]．活死细

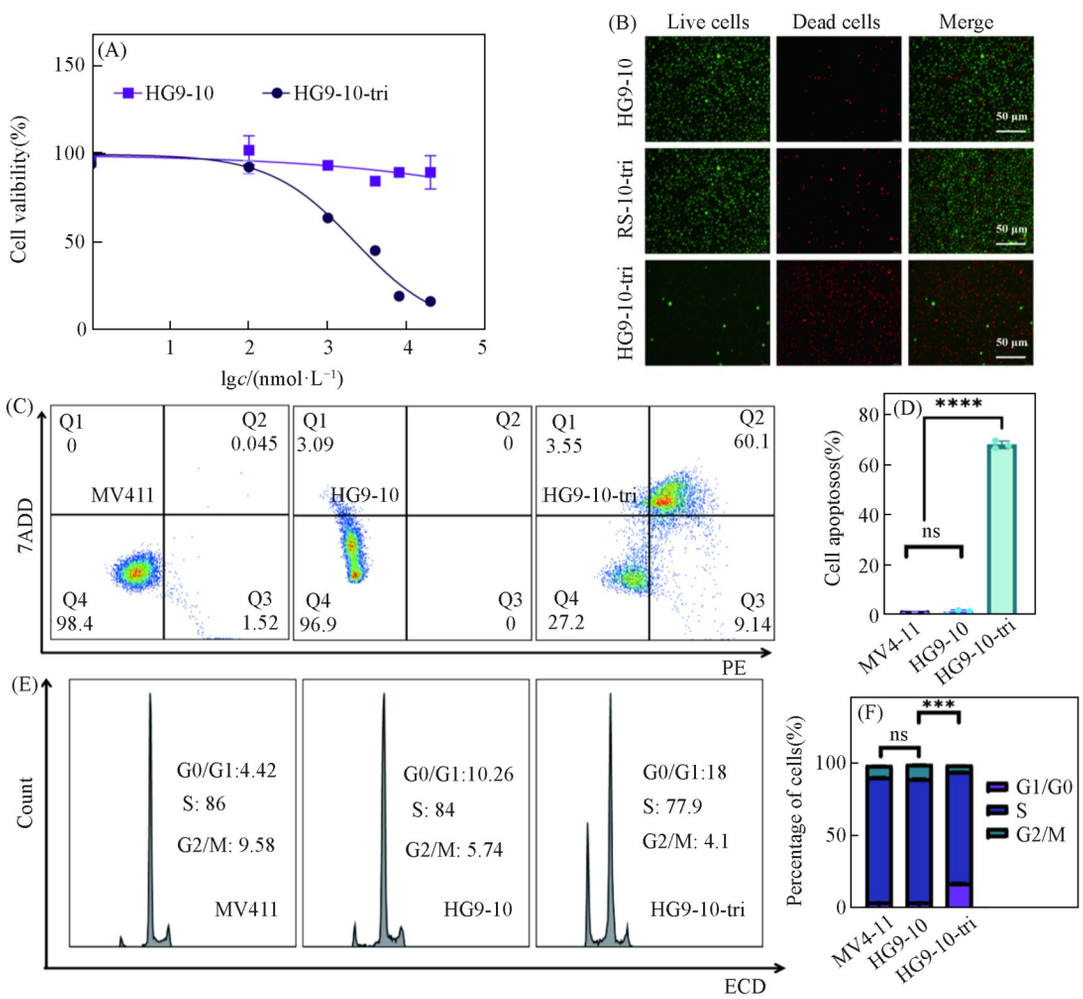


Fig. 5 Effects of HG9-10-tri on apoptosis and cell cycle in MV4-11 cells

(A) CCK-8 assay results of HG9-10-tri cytotoxicity on MV4-11 cells(IC_{50} of HG9-10-tri=2458 nmol/L, IC_{50} of HG9-10=9898 nmol/L); (B) live/dead cell staining; (C) apoptosis of MV4-11 cells induced by HG9-10-tri (72 h treatment); (D) quantitative analysis of apoptosis in MV4-11 cells treated with HG9-10-tri; (E) cell cycle distribution of MV4-11 cells after 72 h treatment with HG9-10-tri (flow cytometry analysis and quantitative statistics); (F) quantitative analysis of cell cycle distribution in MV4-11 cells treated with HG9-10-tri.

胞双染色实验(Calcein-AM/PI)证实，HG9-10-tri处理组中死亡细胞比例显著高于HG9-10对照组[图5(B)]，表明该嵌合体能有效诱导MV4-11细胞死亡．上述结果表明，靶向降解CD71可直接损害细胞的生存能力．

为深入阐明其抑制增殖与诱导死亡的机制，考察了HG9-10-tri处理对MV4-11细胞凋亡的影响．使用Annexin V-FITC/PI双染试剂盒进行细胞凋亡分析，由[图5(C)和(D)]可见，Q2和Q3区细胞约占总细胞比的60%，表明HG9-10-tri能够显著诱导MV4-11细胞凋亡．为探究HG9-10-tri对MV4-11细胞周期进程的影响，采用碘化丙啶(PI)染色法进行了流式细胞术分析．如图5(E)和(F)所示，与未处理的对照组相比，用HG9-10-tri处理72 h后，可诱导MV4-11细胞发生显著的G1期周期阻滞．以上结果表明，基于HG9构建的LYTACs分子HG9-10-tri通过降解CD71，可有效抑制白血病细胞的活力，并诱导凋亡与G1期阻滞，从而将蛋白水平调控转化为明确的抗肿瘤功能输出，为白血病的靶向治疗提供了一种新的策略．

3 结　　论

本文选用具有高效内吞特性的核酸适体HG9作为靶向模块，构建了HG9-10-tri嵌合体分子．通过协同利用适体自身内吞作用和ASGPR通路特性，优化了连接子长度参数．实验结果表明，HG9-10-tri不仅保留了良好的靶向亲和性，而且在小鼠模型中展现出优异的肿瘤靶向能力．该分子的稳定性保持不变，且能通过溶酶体途径具有时间与浓度梯度高效地降解MV4-11白血病细胞的CD71蛋白．机制研究表明，ASGPR通过网格蛋白途径进入胞内，且采用对CD71无靶向作用的对照序列RS-10-tri处理细胞后，其CD71降解效果明显下降，说明HG9-10-tri偶联CD71与ASGPR协同进入溶酶体中进行蛋白降解．CCK8实验结果表明，这种降解作用显著抑制了细胞活力，并诱导AML细胞发生凋亡(凋亡率达69.24%)和周期阻滞(相比于空白组增加了14.54%)．本研究揭示了通过溶酶体途径特异性清除CD71治疗相关血液肿瘤的潜在临床应用前景，为LYTACs技术的靶向降解CD71蛋白疗法提供了实验依据和理论支持．

参　考　文　献

[1] Wolska-Washer A., Smolewski P., *Cancers*, **2022**, *14*(15), 3778
[2] Rehman M. U., Wu X. X., Chen Q. , Liu Z. W., Long S. H., *Bioorg. Chem.*, **2025**, *167*, 109249
[3] Yi W. W., Zhang J. H., Huang Y. X., Zhan Q., Zou M., Cheng X., Zhang X. G., Yin Z. N., Tao S., Cheng H., Wang F. D., Guo J., Ju Z. Y., Chen Z. Y., *Leukemia*, **2024**, *38*(5), 1003—1018
[4] Wang F., Lv H. H., Zhao B., Zhou L. F., Wang S. H., Luo J., Liu J. Y., Shang P., *J. Exp. Clin. Canc. Res.*, **2019**, *38*(1), 406
[5] Liu Y., Liu Y., Tong Y., *Pharm. Inf.*, **2020**, *9*(3), 92—102(刘洋, 刘煜, 童玥. 药物资讯, **2020**, *9*(3), 92—102)
[6] Zhen Y. Z., Chen Y. X., Hu J. D., *J. Leuk. Lymphoma*, 2022, *31*(7), 441—444(郑湧智, 陈艳欣, 胡建达. 白血病·淋巴瘤, **2022**, *31*(7), 441—444)
[7] Wei Y. Y., Zhang X. Z., Zhang F., Li Z. B., Wang N. N., Liu S., Yue B. H., *J. Exp. Hematol.*, **2015**, *23*(1), 234—240(魏园玉, 张晓飏, 张帆, 李婴博, 王宁宁, 刘帅, 岳保红. 中国实验血液学杂志, **2015**, *23*(1), 234—240)
[8] Płoszyńska A., Ruckemann-Dziurdzińska K., Jóźwik A., Mikosik A., Lisowska K., Balcerska A., Witkowski J. M., *Folia Histochem. Cyto.*, **2012**, *50*(2), 304—311
[9] Lopes M., Duarte T. L., Teles M. J., Mosteo L., Chacim S., Aguiar E., Pereira-Reis J., Oliveira M., Silva A. M. N., Gonçalves N., Martins G., Kong I. Y., Zethoven M., Vervoort S. J., Martins S., Quintela M., Hawkins E. D., Trigo F., Guimarães J. T., Mariz J. M., Porto G., Duarte D., *Blood adv.*, **2021**, *5*(16), 3102—3112
[10] Bordini J., Galvan S., Ponzoni M., Bertilaccio M. T. S., Chesi M., Bergsagel P. L., Camaschella C., Campanella A., *Leukemia*, **2017**, *31*(4), 967—970
[11] Grignano E., Birsen R., Chapuis N., Bouscary D., *Front. Oncol.*, **2020**, *10*, 586530
[12] Rodríguez J. A., Luria-Pérez R., López-Valdés H. E., Casero D., Daniels T. R., Patel S., Avila D., Leuchter R., So S., Ortiz-Sánchez E., Bonavida B., Martínez-Maza. O., Charles A. C., Pellegrini M., Helguera G., Penichet M. L., *Leukemia Lymphoma*, **2011**, *52*(11), 2169—2178
[13] Voss K., Sewell A. E., Krystofiak E. S., Gibson-Corley K. N., Young A. C., Basham J. H., Sugiura A., Arner E. N., Beavers W. N., Kunkle D. E., Dickson M. E., Needle G. A., Skaar E. P., Rathmell W. K., Ormseth M. J., Major A. S., Rathmell J. C., *Sci. Immunol.*, **2023**, *8*(79), eabq0178

[14] Garciaz S., Bories, P., Boher J. M., Hospital M. A., Récher C., Saillard C., Hicheri Y., Belanger C., Monteiro R., Hermine O., Launay P., Vey N., *Blood*, **2023**, *142*(Supplement1), 4290
[15] Venkatesan J., Murugan D., Lakshminarayanan K., Smith A. R., Thirumalaiswamy H. V., Kandhasamy H., Zender B., Zheng G. R., Rangasamy L., *Pharmacol. Ther.*, **2024**, *263*, 108725
[16] Chen X. H., Ji M. M., Bai X. , Zhang T. L., Li X. , Wang Y. R., Li W. , Geng H. M., Li X. , Lu J. , Tang J. L., Liu K. D., Yuan B. Y., Li Z. H., *Chem. Eng. J.*, **2025**, *511*, 161974
[17] Li Y. Q., Liu X. L., Yu L., Huang X., Wang X., Han D., Yang Y., Liu Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(45), 24506—24521
[18] Wu Y. Q., Lin, B. Q., Lu Y. Z., Li L. , Deng K. Y., Zhang S. H., Zhang H. M., Yang C. Y., Zhu Z., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(15), e202218106
[19] Huang Q., Liu X., Zhang P. G., Wu Z., Zhao Z. L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2022**, *38*(4), 928—934
[20] Huang B. W., Abedi M., Ahn G., Coventry B., Sappington I., Tang C., Wang R., Schlichthaerle T., Zhang J. Z., Wang Y. J., Goreshnik I., Chiu C. W., Chazin-Gray A., Chan S., Gerben S., Murray A., Wang S. Z., O'Neill J., Yi L., Yeh R., Misquith A., Wolf A., Tomasovic L. M., Piraner D. I., Gonzales M. J. D., Bennett N. R., Venkatesh P., Ahlrichs M., Dobbins C., Yang W., Wang X. R., Sahtoe D. D., Vafeados D., Mout R., Shivaei S., Cao L. X., Carter L., Stewart L., Spangler J. B., Roybal K. T., Greisen P. J., Li X. C., Bernardes G. J. L., Bertozzi C. R., Baker D., *Nature*, **2025**, *638*(8051), 796—804
[21] Liu J. H., Chen Y. M., Cai X. Q., *Acta Pharm. Sin.*, **2022**, *57*(2), 313—320(刘京虹, 陈怡敏, 蔡晓青. 药学学报, **2022**, *57*(2), 313—320)
[22] Kougentakis C., Shurtleff M. J., Lieser R. M., Chen T., Collins C. L., Johnson I. E., Gu S. Y., Akama K. T., Doran K. H., Fung C. K., Hildebrandt D. J., Khaleghi R., Li D., Rank S., Tran T. T., Yau R., Holly R. W., Langsdorf C., Lindhout D. A., McWhirter S. M., Iwig J. S., Lewis J. G., Staben S. T., Turtle E. D., Lind N. A., *bioRxiv*, **2025**, doi: http://doi.org/10.1101/2025.01.12.632472
[23] Wang X. M., Zhang C. L., Chen Y. Z., *Chin. J. Hosp. Pharm.*, **2023**, *43*(10), 1170—1175(王熙敏, 张程亮, 陈云舟. 中国医院药学杂志, **2023**, *43*(10), 1170—1175)
[24] Zhang N., Bing T., Shen L. Y., Feng L., Liu X. J., Shangguan D. H., *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*(16), 8923
[25] Zhang N., Wang J. Y., Bing T., Liu X. J., Shangguan D. H., *Mol. Ther.-Nucl. Acids*, **2022**, *27*, 1249—1259
[26] Owen C., Fader K. A., Hassanein M., *Bioanalysis*, **2024**, *16*(5), 319—328
[27] Zhou X., *Mol. Cancer Ther.*, **2024**, *23*(12_Supplement), IA017
[28] Wu X. Q., Zhao Z. L., Bai H. R., Fu T., Yang C., Hu X. X., Liu Q. L., Champanhac C., Teng I. T., Ye M., Tan W. H., *Theranostics*, **2015**, *5*(9), 985—994
[29] Liu J., Liu X. J., Yi M. W., Sun Y., Bing T., Zhang N., Shangguan D. H., *Chem. Commun.*, **2022**, *58*(77), 10797—10800
[30] Chen J. L., Wang J. Q., Sui B. L., Jiang P. W., Wang X. M., Wang H. D., Liang F., *JACS Au*, **2025**, *5*(5), 2246—2256

(Ed.: L, F, K)